

Purinerger jelátvitel vizsgálata a központi idegrendszerben magas felbontású vizsgálati módszerekkel

Doktori tézisek

Heinrich Attila

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlág Beáta tudományos tanácsadó, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Köles László egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Ducza Eszter egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Riba Pál egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Jurányi Zsolt, Ph.D.

Budapest
2013

1. Bevezetés

ATP és extracelluláris bomlásterméke, az adenzin, fontos szerepet játszanak a központi idegrendszer (KIR) fiziológiás és patológias működésében. Először 40 évvel ezelőtt írták le, hogy az ATP szerepet játszik a fájdalomérzés közvetítésében. Későbbi kutatások azt találták, hogy az ATP P2X receptorokon (P2XR) keresztül modulálja a serkentő ingerületátvitelt a gerincvelő hátsó szarvában. További vizsgálatok rámutattak arra, hogy a leszálló monoaminerg pályák egy része a gerincvelői hátsó szarv enkefalinerg interneuronjain végződnek, így fokozzák azok működését. Ennek következtében az interneuronokból felszabadult opioid peptidek gátolják a primer afferensekből felszabadult neurotranszmittereket (glutamát, P-anyag), és ily módon modulálják az ingerület tovaterjedését a felszálló pályákra. Laboratóriumunkban és mások által elvégzett kísérletek rámutattak arra, hogy a noradrenalin (NA) felszabadulása serkenthető a P2X receptorokon keresztül a szimpatikus idegrendszer végződéseiből. Elektrofiziológiai vizsgálatok pedig arra szolgáltatottak bizonyítékot, hogy a P2XR-ok aktivációja serkenti a gerincvelőbe a II. és V. laminában belépő primer afferensek glutamát felszabadulását. Ez a moduláció P2X₃, P2X_{1/5} és P2X_{4/6} receptorokon keresztül valósul meg. Kimutatták azt is, hogy a P2Y receptorok gátolják a N-típusú kalcium csatornát a hátsó gyöki ganglionban (DRG), mely hatás csökkentheti a glutamát felszabadulását a gerincvelő hátsó szarv végződéseiből, így részben ellensúlyozhatja az ATP algogén hatását.

Kutatásaink második szakaszában a purinok és a glutamát együttes felszabadulását vizsgáltuk idegi depolarizáció hatására patkány hippocampusz szeletekben. Fiziológiás idegi aktivitást modellező elektromos ingerlés hatására, valamint patológias körülmények során (oxigén és glukóz megvonás) ATP és adenzin szabadul fel a központi idegrendszerben. Az így felszabadult purinok az ionotróp (P2XR) és metabotróp (P2YR) receptorokon keresztül modulálják a szinaptikus aktivitást a központi idegrendszer különböző területein, beleértve a hippocampuszt is. Az adenzin, ugyancsak metabotróp adenzin receptorokon (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) keresztül, pre- és posztzinaptikusan csökkentik a serkentő neurotranszmissziót fiziológiás és patológias körülmények között. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a P2X receptorok aktivációja glutamát felszabadulást váltott ki az agytörzsben, a hippocampuszban és kortikális szinaptoszómákban. Ezen hatásokért a következő purin receptor altípusok a felelősek: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X_{2/3} és P2X₇. Emellett megfigyelték azt is, hogy a P2Y receptorok serkentették a glutamát felszabadulást a KIR-ben a P2Y₄ és P2Y₁ receptorokon keresztül. Más vizsgálatok viszont arra jutottak, hogy az ATP és metabolikusan stabil

analógjai gátolták a depolarizáció által kiváltott glutamát felszabadulást agyszeletekben, valamint a P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₄ receptorok aktivációja is gátolta a glutamát felszabadulását a hippocampális piramis sejtekből; továbbá az ATP extracelluláris bomlásából származó adenozin az A₁ receptoron keresztül ugyanilyen gátló hatást közvetített. Sok tanulmány leírta, hogy a glia sejtek, de leginkább az asztrociták fontos szerepet játszanak a KIR és a környéki idegrendszer kommunikációjában. A gliából felszabaduló jelátvivő anyagok közül elsősorban a purinok és a glutamát a glia-neuron és glia-glia kommunikáció fő mediátorai. Ez a kommunikáció a sejten belüli Ca²⁺ raktárak mobilizációjával valósul meg, melyet az asztrocitából felszabadult ATP és glutamát válthat ki (gliotranszmitterek), melynek következtében a szomszédos asztrociták és neuronok között Ca²⁺ hullám generálódik, mely modulálja a szinaptikus transzmissziót és a neuronális excitabilitást. Így pl. a hippocampusban kimutatták, hogy a Schaffer kollaterálisok elektromos ingerlésének hatására az asztrocitákban aktiválódik az AMPA glutamát receptor, mely ATP felszabadulást okoz, és az így felszabadult ATP és bomlás terméke az adenozin P2Y és A₁ receptorokon keresztül csökkenti a szinaptikus gátlást.

2. Célkitűzés

1. A radioizotópos neurotranszmitter felszabadulást tanulmányozó kísérletek segítségével a következő kérdésekre szerettem volna választ kapni:

a. A P2-receptorok aktivációja milyen irányban és milyen mértékben befolyásolja a monoamin és aminosav transzmitterek felszabadulását a gerincvelőben?

b. A közvetített hatás milyen mértékben függ az alkalmazott agonisták fajtájától illetve koncentrációjától? (dózishatásgörbe felvétele, agonista profil meghatározása)

c. Milyen P2-receptor altípusok közvetítik a hatást? (szelektív antagonisták használata, receptor altípusok farmakológiai azonosítása)

2. RT-PCR analízis felhasználásával megvizsgáltuk, hogy:

a. Mely P2Y receptor altípusok expresszálódnak a patkány gerincvelő, agytörzs és hátsó-gyöki ganglionban?

3. Real-time bioszenzor technika segítségével választ kerestünk az alábbi kérdésekre:

a. Mi a K^+ -depolarizáció által kiváltott ATP, adenosin és glutamát felszabadulás forrása, mechanizmusa, pontos dinamikája patkány hippocampusban?

b. A K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban milyen P2 és egyéb receptorok (P1, ionotróp glutamát receptor) vesznek részt és milyen receptor-altípusok közvetítik a hatást?

c. Az ATP és a glutamát időben hogyan hatnak egymás felszabadulására?

3. Módszerek

3.1 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) analízis

A biológiai szövetekből a teljes RNS tartalmat Trizol izolációs reagenssel segítségével szeparáltuk. Az RNS-t (1 µg, 2 µL) Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit-tel, random hexamer primereket használva átírtuk cDNS-re. A PCR reakcióban különböző P2Y receptor altípusokra specifikus primereket alkalmaztunk a cDNS-ek amplifikációjára, míg β-aktin primereket a kontroll amplifikációra. A következő primer szekvenciákat használtuk a reakcióban: P2Y₁₂ receptor azonosításához: CAGGTTCTCTTCCCATTGCT forward primert és CAGCAATGATGATGAAAACC reverz primert, P2Y₁₃ receptor azonosításhoz: GGCATCAACCGTGAAGAAAT forward primert és GGGCAAAGCAGACAAAGAAG reverz primert, míg a β-aktin esetében: ATGGATGACGATATCGCTG forward primert és ATGAGGTAGTCTGTCAGGT reverz primert terveztünk.

Az amplifikáció feltételei a következők voltak: 5' kezdeti denaturáció 95°C-on, 5 percre, hot start 80°C-on, majd 94°C-on 1'-ig, 59°C-on 1'-ig és 72°C-on 1'-ig 40 ciklusig, majd végső extenzió 72°C-on, 5' -ig. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel elemeztük.

3.2 Tríciált noradrenalin (³H]NA) és glutamát (³H]GLUT) felszabadulás mérése patkány gerincvelőből

A patkányokat dekapitáltuk, majd a gerincvelőt kiemeltük a gerinccsatornából és jéghideg karbogenizált (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs oldatba (összetétele mmol/L-ban: NaCl 113, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, glükóz 11.5, pH 7.4) helyeztük, mely aszkorbinsavat (30 µmol/L) és Na₂EDTA-t (100 µmol/L) tartalmazott.

A gerincvelő lumbális szakaszát a környező szövetektől megtisztítottuk, majd McIlwain Tissue Chopper szövetszeletelő segítségével 400 µm-es szeleteket vágunk. A gerincvelő szeleteket 30 percre keresztül inkubáltuk 1 mL Krebs oldatban: noradrenalin felszabadulás vizsgálata esetén 37°C-ra melegített oldathoz tríciált noradrenalint adtunk (2.5 µCi/mL, [³H]NA, Amersham), glutamát felszabadulás vizsgálatánál az inkubáció 32°C-on glutamát izotóp (1 µCi/mL, [³H]GLUT, Amersham) jelenlétében történt. Ezt követően a preparátumokat folyamatosan 37 °C-os (noradrenalin), illetve 32 °C-os (glutamát) karbogenizált Krebs oldattal áramoltattunk át 0.65 mL/min sebességgel, ezzel biztosítva a nem specifikusan kötött tríciált noradrenalin és glutamát eltávolítását a rendszerből. Egy 60 perces ekvilibrációs periódust követően a szöveten átfolyó oldatból 3 perces mintákat gyűjtöttünk és meghatároztuk neurotranszmitter (noradrenalin és glutamát) tartalmukat. A

mintagyűjtési periódus alatt a 6. illetve 39. percben (S_1 , S_2) elektromos téringerlést alkalmaztunk (Grass S88 stimulátor). A drogokat a két ingerlés között a 24. perctől adagoltunk a perfúzióban. Az elektromos ingerlési paraméterek a következők voltak: unipoláris négyszögimpulzusok, noradrenalin felszabadulás vizsgálata esetén 40 V, 3 Hz, 1 msec, 2 perc; glutamát felszabadulás vizsgálata esetén 40 V, 15 Hz, 3.5 msec, 1 perc. A kísérletek végeztével a szöveteket 0.5 mL 10% triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 30 perc elteltével a szöveti minták 100 μ L aliquotjainak radioaktivitását határoztuk meg. A minták radioaktivitását Packard 1900 Tricarb szcintillációs spektrométer (Canberra, Australia) segítségével határoztuk meg.

3.3 $P2Y_1$ -receptor immunhisztokémia

Hímnemű 140-160 grammos Wistar patkányokat használtunk. A kísérleti állatokat dekapitáltuk, majd a sérülésmentesen eltávolított gerincvelőt a gerinccsatornából fixáló oldatba helyeztük (4% paraformaldehid 0.1 M foszfát pufferben, PB), pH 7.4. A fixálás aznap szobahőmérsékleten váltott fixáló oldatokkal, éjszaka 4 °C-on folytatódott. A fixáló oldatot másnap foszfátpufferrel (PB) kimostuk és a gerincvelőből Leica vibratómmal (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 35 μ m-es keresztmetszeti szeleteket vágunk.

3.3.1. Immunfluoreszcens festés

A szeleteket blokkoló oldatban (5% bovine serum albumin, BSA) foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) tartottuk egy órán át szobahőmérsékleten, hogy lekössük a nem specifikus kötőhelyeket, majd az első antitestekkel, a vezikuláris glutamát transzporter1 (VGLUT1) nyúl poliklonális antitest 1:3000 hígításban, ill. a $P2Y_1$ receptor elleni antitest (nyúl, poliklonális) 1:200 hígítású oldatában tartottuk egy éjszakán át hűtőszekrényben, 4°C-on. A VGLUT1 antitest affinitás kromatográfiával tisztított fehérje volt, amit a patkány VGLUT1 456-560 aminosavrézlete ellen állítottak elő, míg a $P2Y_1$ antitestet a patkány, illetve humán $P2Y_1$ receptor 242-258 aminosavszekvenciája ellen termeltették. Az elsődleges antitestek PBS-sel történt gondos kimosása után a szeleteket Alexa Fluor488 vagy Alexa Fluor594 kecskében termelt nyúl IgG elleni másodlagos antitest 1:500 hígítású oldatában, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk 2 órán át. Az antitestek desztillált vizes kimosása után a szeleteket tárgylemezre húztuk, VectaShield segítségével lefedtük és SPOT RT színes digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.3.2. Fény- és elektronmikroszkópia

A szöveti endogén peroxidáz aktivitást 3% H_2O_2 (15 perc, szobahőmérséklet) oldat alkalmazásával megszüntettük, a H_2O_2 nyomait pedig 0.1 M PBS-sel történt mosással távolítottuk el. Ezt követően a Triton X100 kis koncentrációban való alkalmazása (0.1%, 15 perc) segítette az antitesteknek a metszetekbe való bejutását és áthatolását. Gondos mosás után 5% normál kecske szérummal blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket (szobahőmérséklet, 2 óra), majd az elsődleges antitestekkel inkubáltuk a szeleteket: 1:3000 VGLUT1 (Synaptic Systems) vagy 1:200 P2Y₁. Ismételt PBS-mosás után biotinilált nyúl IgG elleni általános másodlagos antitestet használtunk (szobahőmérséklet 2 óra) majd a Vector ABC-3,3 diaminobenzidine (DAB) készletet használtuk a gyártó előírása szerint (Vector Laboratories). A mikroszkópos képek Olympus 70D kamerával és DPC Controller programmal (Olympus Ltd., Tokyo, Japan) felszerelt Zeiss Axioplan 2 mikroszkóppal készültek.

Azokat a metszeteket, melyeket elektronmikroszkópos vizsgálatra szántunk 1% OsO_4 (Taab Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, England) oldatban szobahőmérsékleten, 30 percig utófixáltuk, majd felszálló alkoholsorban (50, 70, 90, 96, abszolút alkohol) víztelenítettük. A teljes víztelenítés után a gerincvelő szeleteket Taab 812 epoxigyantába (Taab Equipment Ltd., Aldermaston, Berkshire, England) ágyaztuk, 60°C-on, 12 órán át polimerizáltuk, majd Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 50-70 nm-es metszeteket készítettünk, melyeket a Hitachi 2001 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi, Tokyo, Japan) vizsgáltunk.

3.4 Extracelluláris és bioszenzoros elvezetés

A kísérletekben 4 hetes, 85-110 grammos hím Wistar patkányokat használtunk fel. A patkány dekapitációja után a koponyatetőt a durával együtt eltávolítottuk, az agyat kiemelve azonnal jéghideg módosított mesterséges cerebrospinális folyadék (aCSF) oldatba helyeztük, amely 11 mmol/L Mg^{2+} -t tartalmazott. A hippocampusokat megtisztítva a környező szövetől 400 μm vastagságú szeleteket készítettünk vibratom segítségével.

3.4.1 Extracelluláris elvezetés patkány hippocampus szeletekből

Az előkészített szeleteket áthelyeztük egy perfúziós kamrába, melyben 6 mL/perc sebességgel aCSF oldatot áramoltattunk. A hippocampus CA1 régió *stratum radiatum* rétegében, a Schaffer kollaterálisok ingerlése következtében létrejött mező serkentő

posztszinaptikus potenciálokat (fEPSP) aCSF-fel feltöltött üveg mikroelektróda (1B150F-4, < 2 MΩ) segítségével vezettük el. Az ingerlés paraméterei a következők voltak: 3-7 V, 0.1 ms, 15 másodperc. Az extracelluláris DC elvezetéseket aCSF oldattal feltöltött boroszilikát üveg pipetta (GC120F-10, 4-7 MΩ, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) segítségével végeztük. A fEPSP jeleket AC módban egy ISO-80 bio-amplifier készülékkel, míg az extracelluláris DC jeleket Multiclamp 700A típusú műszerrel felerősítve, pCLAMP 9 szoftver segítségével 10kHz-en rögzítettük.

3.4.2 ATP, adenozin, inozin és GLUT bioszenzor elvezetés patkány hippocampusz szeletekből

A kontinensen elsőként általunk használt módszert Llaudet és mtsai munkája alapján validáltuk és állítottuk be. A szenzorok (Sarissa Biomedical) 50 μm ármérőjű és 0.5 mm hosszú platina szálai enzimekkel vannak bevonva, melyek ATP, adenozin, inozin, illetve glutamát jelenlétében H₂O₂-t termelnek, amit elektrokémiaiag detektálni tudunk. Az ATP szenzort két enzim: a glycerol-kináz (EC 2.7.1.3) és a glycerol-3-foszfát oxidáz (EC 1.1.3.21); az adenozin szenzort (ADO) három enzim: az adenozin-deamináz (EC 3.5.4.4), a nukleozid-foszforiláz (EC 2.4.2) és a xantin-oxidáz (EC 1.1.3.22); míg a glutamát szenzort (GLUT) a glutamát-oxidáz (EC 1.4.3.11) enzim építi fel.

A mérés során kettős elvezetést használunk: az ATP és GLUT szenzor esetében párhuzamosan NULL szenzort is alkalmaztunk. A NULL szenzor szerkezetileg megegyezik az ATP és GLUT szenzorral, csak az enzimek a felületén blokkolva vannak, így a szenzorok nem érzékelik az ATP és a glutamát jelenlétét a szenzor közvetlen környezetében, így a szenzor alkalmas a háttérzaj regisztrálására: ATP és GLUT szenzor esetében a szenzor által regisztrált jelből kivonjuk a NULL szenzor által regisztrált háttérzajt, így a nettó ATP és nettó glutamát jelet (netATP, netGLUT) kapjuk. Az ADO szenzor a detektációs felülete közelében lévő adenozin és inozin jelenlétére is érzékeny, ezért a méréseket úgy terveztük, hogy az adenozin szenzor jelenlétében párhuzamosan INO szenzort is használunk, így a nettó adenozin (netADO) jelet úgy határozzuk meg, hogy az ADO szenzor jeléből kivonjuk az INO szenzor jelét. Az INO szenzor érzékeny felületén az adenozin-deamináz enzim blokkolva van, ezért a szenzor csak a környezetében lévő inozinra lesz érzékeny. Ily módon a „netADO” csak az adenozin jelenlétét reprezentálja.

3.4.3 Mikroelektród bioszenzor kísérletek tervezése

Minden kísérlet előtt ismert koncentrációjú ATP (10 $\mu\text{mol/L}$), adenozin (3 $\mu\text{mol/L}$), inozin (10 $\mu\text{mol/L}$) és glutamát (10 $\mu\text{mol/L}$) mérésével ellenőriztük a szenzorok érzékenységét, majd a szenzorok érzékeny végét óvatosan belehelyeztük mikromanipulátorok segítségével a hippocampusz szeletek CA1 régiójába, figyelve arra, hogy a bioszenzorok közel legyenek egymáshoz, de ne érjenek össze. 20 perc ekvibrációs periódus eltelte után a szenzorok elérték a „steady-state” alapvonalat, ezután kezdtük el a mintavételezést. A mérések során általában a következő mérési lépéseket követtük: a mintavétel első percében a patkány hippocampusz szeleteket magas K^+ tartalmú aCSF oldattal ingereltük 270 másodpercen keresztül. Azokban a kísérletekben, melyekben valamilyen gátlószer hatást vizsgáltunk, az antagonistát tartalmazó aCSF oldatot 20 perccel a K^+ depolarizáció előtt juttattuk a hippocampusz szeletre. Ez alól kivételt fluoroacetát (FAC, 1 mmol/L) képezett, amelyet a glia-szelektivitás elérése céljából 10 perccel a K^+ depolarizáció előtt juttattunk a rendszerbe.

3.5 Statisztikai analízis

Az összes adatot n számú megfigyelések $\text{átlag} \pm \text{S.E.M}$ -ként határoztuk meg. Szignifikáns különbségek kimutatásához egy-szemponútú varianciaanalízist (ANOVA) követő Dunnett post hoc tesztet (többszörös összehasonlítás) vagy Student t -tesztet (páros összehasonlítás) végeztünk.

4. Eredmények

4.1 P2X és P2Y receptorok szerepe patkány gerincvelőben

4.1.1 Tríciált glutamát felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben

Kísérleteinkben a P2 receptor altípusok szerepét vizsgáltuk a patkány gerincvelő szeletekből mért tríciált glutamát felszabadulásra. A nyugalmi trícium kiáramlás ezekben a kísérletekben $3.097 \pm 0.160 \%$ volt ($n=8$). Elektromos téringerlés (40 V, 15 Hz, 3.5 msec, 1 perc) jelentős ($EFS_1=6.330 \pm 0.342\%$, $EFS_2=6.016 \pm 0.040\%$) és jól reprodukálható ($EFS_2/EFS_1=1.01 \pm 0.07$, $n=8$) [3H]glutamát felszabadulást idézett elő. Az 1 mmol/L EGTA-val kiegészített Ca^{2+} mentes Krebs' oldat perfúziója esetén az elektromos ingerlés által kiváltott tríciált glutamát felszabadulás 90%-kal csökkent. A kísérleteket a P2 receptor agonisták vizsgálatával folytattuk. Az ATP, ADP és 2-MeSADP kezelés koncentráció függően csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [3H]glutamát felszabadulást a következő hatás erősségi sorrendben: ADP > 2-MeSADP > ATP, miközben a bazális trícium felszabadulást nem befolyásolták.

A P2 receptor agonista ATP metabolikusan stabil analógja a 2-MeSATP 100 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban szignifikánsan gátolta, míg magasabb (200 $\mu\text{mol/L}$ - 300 $\mu\text{mol/L}$) koncentrációban fokozta a patkány gerincvelő szeletekben az ingerlés által kiváltott [3H]GLUT kiáramlást.

A következőkben az ATP (1 mmol/L) gátló hatásának receptor szintű hátterére voltunk kíváncsiak. A több receptor altípuson is ható P2 receptor antagonistá suramin (300 $\mu\text{mol/L}$), illetve a P2Y_{12,13} receptor szelektív antagonistá 2-MeSAMP (10 $\mu\text{mol/L}$) kivédte az 1 mmol/L ATP gátló hatását. Ezekkel az eredményekkel ellentétben a PPADS (30 $\mu\text{mol/L}$, $38.96 \pm 8.1\%$) és a P2Y₁ szelektív antagonistá MRS2179 (10 $\mu\text{mol/L}$, $32.63 \pm 1.36\%$) csak részlegesen ellensúlyozták az ATP gátló hatását. A kísérletben agonistaként használt ATP hidrolízise során jelentős mennyiségű adenzin képződik, melyek különböző adenzin-receptorokon hatva P2 receptoroktól függetlenül is modulálhatják a transzmitter felszabadulást. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára a következő kísérletet végeztük el. A szeleteket P1 (A₁)-adenzin receptor antagonistá DPCPX (100 nmol/L) oldattal kezelve nem tapasztaltunk változást az ATP glutamát felszabadulásra gyakorolt gátló hatásában, vagyis ebben a hatásban adenzin receptorok nem vesznek részt.

A továbbiakban a 2-MeSATP (300 $\mu\text{mol/L}$) serkentő hatását vettük górcső alá. A szelektív P2X₁ receptor antagonistá NF449 100 nmol/L koncentrációban szignifikánsan

kivédte a 2-MeSATP triciált glutamára kifejtett serkentő hatását patkány gerincvelő szeletben.

4.1.2 Triciált noradrenalin felszabadulás vizsgálata patkány gerincvelőben

A kutatásaink következő szakaszában a [^3H]noradrenalin felszabadulást vizsgáltuk meg a patkány gerincvelő szeletekben. A nyugalmi [^3H]transzmitter kiáramlás 0.437 ± 0.015 %-nak adódott ($n=8$). Elektromos stimulus (40V, 2 Hz, 1 ms, 2 perc) hatására 1.363 ± 0.136 % trícium szabadult fel a kontroll kísérletben, a második elektromos ingerlés esetében pedig 1.136 ± 0.083 % (EFS2/EFS1= 0.93 ± 0.03 , $n=8$). A stimulus által kiváltott felszabadulást követően a jelölt noradrenalin kiáramlása gyorsan visszatért az alapvonalra. A fenti kísérleti eredmények átlagát vettük kontrollnak, és minden további mérési eredményt ehhez viszonyítottuk.

A P2 receptor agonisták közül mind az ATP, az ADP és a 2-MeSADP szignifikánsan csökkentették az elektromos ingerlésre kiváltott triciált noradrenalin felszabadulást a gerincvelő szeletekből. Az agonista hatáserősségi sor a következő volt: $\text{ADP} \geq 2\text{-MeSADP} > \text{ATP}$. A legnagyobb gátlás a ADP 30 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációnál volt mérhető.

A következő kísérletekben a P1 és P2 receptorok részvételét vizsgáltuk az ATP [^3H]noradrenalin felszabadulásra gyakorolt gátló hatásában. Az ATP 3 mmol/L koncentrációban szignifikánsan csökkentette az elektromos ingerlésre kiváltott triciált noradrenalin felszabadulást. Ezt a gátló hatást a P2Y_{12,13}-receptor antagonistá 2-MeSAMP (10 $\mu\text{mol/L}$) és a nem szelektív P2Y receptor antagonistá rective blue 2 (RB2, 30 $\mu\text{mol/L}$) teljesen, míg a P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 (10 $\mu\text{mol/L}$) és a P1 receptor antagonistá DPCPX (100 nmol/L) részlegesen védte ki. A suramin (300 $\mu\text{mol/L}$) és a PPADS (30 $\mu\text{mol/L}$) ugyanakkor nem ellensúlyozta az ATP hatását.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a 2-MeSATP milyen moduláló hatást vált ki az elektromosan indukált [^3H]noradrenalin felszabadulásra. A Krebs oldatban a második ingerlés (S_2) előtt 18 perccel perfundált 2-MeSATP (100-300 $\mu\text{mol/L}$) jelentősen megnövelte a kiáramlást a kontrollhoz képest. Ez a hatás a bazális ($0.987 \pm 0.036\%$, $n=4$, $p < 0.001$) és az elektromos ingerlésre kiváltott trícium felszabadulásban is tapasztalható volt.

A PPADS (30 $\mu\text{mol/L}$) és a NF449 (100 nmol/L) kivédte a 2-MeSATP serkentő hatását a [^3H]noradrenalin kiáramlásra. A P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 (10 $\mu\text{mol/L}$) erre nem volt képes; jelenlétében a 2-MeSATP szignifikánsan emelkedést okozott a kontroll kísérlethez képest ($106.63 \pm 2.7\%$).

4.1.3 P2Y receptorok mRNS expressziójának vizsgálata patkány agytörzsben, hátsó-gyöki ganglionban és gerincvelőben

Az RT-PCR reakció során a patkány gerincvelőben, agytörzsben és DRG-ben a P2Y₁₃ receptor altípust kódoló mRNS kifejeződött, míg a P2Y₁₂ receptor altípus mRNS-e csak az agytörzsben volt kimutatható.

4.1.4. P2Y₁ receptor immunohisztokémiai vizsgálata

A P2 receptorok közül a P2Y₁ jelenlétét vizsgáltuk az ellenük előállított specifikus antitestek segítségével, de előtte VGLUT1 jelöléssel azonosítottuk a gerincvelőben a glutamaterg idegi végkészülékeket. Az elektronmikroszkópos ábra immun-DAB festéssel mutatja a VGLUT1-re utaló immunreaktivitást glutamaterg idegvégződés elektronmikroszkóposan “üresnek” látszó hólyagocskáinak membránján. A P2Y₁ receptorra végzett immunfestés a VGLUT1 jelöléstől eltérő képet mutatott a gerincvelő nyaki szakaszának keresztmetszeti szeletén. A legerőteljesebb festődést az I-II rétegekben kaptuk, és a festés erőssége a hátsó szarvi metszet közepe felé haladva gyengült. Elektronmikroszkópos szinten P2Y₁ receptor jelenlétére utaló festődést csak dendritekben találtunk, szinapszisokban nem. Korábbi vizsgálatainkkal megegyező módon figyeltünk meg P2Y₁ immunpozitivitásra utaló DAB csapadékot endotélsejtek lumenális oldalán (vérpálya felőli oldal), ahol valószínűleg az itt előforduló kaveolákban található.

4.2 K⁺ depolarizáció által kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás mérése patkány hippocampusz CA1 régiójában mikroelektrod bioszenzor segítségével

Kutatásaink második szakaszában a purinok és a glutamát együttes felszabadulását vizsgáltuk kálium depolarizáció (25 mmol/L, 270 sec) hatására patkány hippocampusz szeletekben. E célból az izolált, 400 µm vastagságú patkány hippocampusz szeleteket az *in vitro* szuperfúziós rendszerbe helyeztük és valós idejű mikroelektrod-bioszenzor technika segítségével vizsgáltuk.

4.2.1. Nyugalmi és K⁺ depolarizációra kiváltott ATP, adenozin és glutamát felszabadulás patkány hippocampuszban

Először a hippocampusz szeletek nyugalmi ATP, adenozin és glutamát felszabadulására voltunk kíváncsiak. Az első lépésben a szenzorokat belehelyeztük a szövet-szelet kamrába és megvártuk, hogy a szenzorok elérjék az ekvilibrum állapotot (általában 20

perc). Ezt követően a patkány hippocampusz szeletekbe óvatosan beleszúrtuk a bioszenzorokat. Az ily módon elért nyugalmi helyzet beállta után kapott jel, illetve a szelet nélkül mért bioszenzor jel különbsége, - levonva abból a referencia szenzor jelét - mutatja a bazális ATP, adenozin és glutamát felszabadulást, amely néhány nmol/L nagyságrendűnek bizonyult (ATP: 4.1 ± 0.8 pA, n=10; ADO: 5.4 ± 0.7 pA, n=10; GLUT: 6.4 ± 0.8 pA, n=10). Pontos koncentráció értékeket nem tudtuk meghatározni, mivel ezek az értékek a detekció határának közelébe és ezáltal a kalibrációs görbe lineáris tartományán (300 nmol/L és 50 μ mol/L koncentráció tartomány) kívül estek. A következőkben a hippocampusz szeleteket 25 mmol/L-os kálium (270 sec) tartalmú aCSF oldattal perfundáltuk, mely hatására gyors, ugyanakkor reverzibilis ATP, adenozin és glutamát szignál emelkedést regisztráltunk. A kísérletek egy részében egyidejűleg regisztrált DC elvezetésben a K^+ depolarizáció hatására a „*spreading depression*” (SD) jelenség megjelenését észleltük, ahogy azt korábbi irodalmi adatok is leírták. Az ATP két fázisban szabadult fel, az első fázis végét az SD megjelenése determinálta, mely a K^+ depolarizáció adást követően a 3.81 ± 0.2 percen jelent meg (n=5). Az adenozin kiáramlás K^+ stimulus kezdete után a 0.79 ± 0.01 percen volt detektálható (0.48 ± 0.16 μ mol/L), míg a maximumát 10.28 ± 1.41 μ mol/L koncentrációnál érte el (7.31 ± 0.01 perc, n=8). A glutamát felszabadulást a kontroll kísérletben a 2.68 ± 0.04 percen regisztráltuk és a legnagyobb koncentrációt a 5.62 ± 0.06 percen (3.49 ± 0.84 μ mol/L, n=8) érte el a K^+ depolarizációt követően. Az ATP a 2.56 ± 0.05 percen volt először detektálható a 25 mmol/L kálium stimulust követően. Az első fázisban az ATP szignál csúcsa a SD kialakulása előtt már regisztrálható volt (0.48 ± 0.16 μ mol/L), mely egybeesett a glutamát felszabadulásával. A második fázisban 1.23 ± 0.023 μ mol/L-os maximum ATP koncentrációt mértünk (8.08 ± 0.01 perc, n=8). A NULL szenzor az alapvonalon fluktuált.

Az ATP szenzorral egy időben a *stratum radiatum*-ból elvezetett mező-serkentő poszt-szinaptikus potenciálokat (fEPSP) regisztráltunk. A hippocampusz szeletek magas K^+ okozta SD alatt elveszítik az elektrofiziológiai aktivitásukat, amelyet ugyanakkor a kimosási fázisban teljes mértékben visszanyertek, igazolván a szelet megtartott életképességét.

4.2.2. Honnan származik a K^+ depolarizációra felszabadult adenozin?

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a hippocampuszban jelen vannak az ektonukleotidáz enzimek. Mivel az ATP nagy mennyiségben szabadul fel a K^+ depolarizációra, felmerül annak a lehetősége, hogy az ATP felszabadulását követően az extracelluláris térben ektoATPáz enzim jelenlétében adenozinná bomlik. Ennek a kérdésnek a tisztázása céljából a mások által is használt szelektív ekto-ATPáz inhibitor ARL67156-t (100

$\mu\text{mol/L}$) használtuk, mely az alkalmazott koncentrációban az extracelluláris ATP lebomlását bár nem teljes mértékben, de jelentősen gátolja. Az ARL67156 hatására szignifikánsan megemelkedett az K^+ depolarizáció által előidézett ATP felszabadulás ($8.62 \pm 0.76 \mu\text{mol/L}$, $n=8$, $p<0.01$), valamint az ATP szint emelkedése már hamarabb, a K^+ stimulus utáni 1.69 ± 0.012 percen detektálható volt. Ezzel ellentétben azt tapasztaltuk, hogy az adenozin felszabadulás jelentősen csökkent ($0.15 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$, $n=6$) a gátlószer jelenlétében, miközben a glutamát kiáramlás mennyiségét nem változtatta meg. A következő kísérletben az ARL67156 ($100 \mu\text{mol/L}$) és adenozin transzporter gátló dipiridamol ($50 \mu\text{mol/L}$) együttes hatását vizsgáltuk. Ebben az esetben az adenozin kiáramlása a hippocampusz szeletekből magasabb értéket mutatott, mint csak az ektoATPáz inhibitor jelenlétében ($2.71 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$). Ezek az eredmények alapján arra következtettünk, hogy az ADO szenzor egyrészt az ATP extracelluláris bomlásából származó adenozint érzékeli, valamint direkt adenozin felszabadulást is detektál.

4.2.3. Az ATP, adenozin és glutamát felszabadulása hogyan függ az extracelluláris Ca^{2+} szinttől?

Mivel a vezikuláris transzmitter felszabadulás $[\text{Ca}^{2+}]_o$ függő, és korábbi munkákban az ATP felszabadulást is $[\text{Ca}^{2+}]_o$ függőnek találták, megvizsgáltuk, hogy a depolarizáció által kiváltott ATP felszabadulást a mi kísérleteinkben is az extracelluláris Ca^{2+} -ion beáramlása váltja-e ki. Ennek ellenőrzésére a következő kísérletet végeztük el: a kísérletben használt aCSF oldatot Ca^{2+} -mentes és Ca^{2+} -kelátor EGTA (1 mmol/L)-t tartalmazó oldatra cseréltük. Az így elvégzett mérésben az ATP ($0.21 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$) és az adenozin ($0.22 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$), 25 mmol/L K^+ hatására felszabadult mennyisége szignifikánsan csökkent, ugyanakkor a glutamát kiáramlása nem változott ($3.64 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p>0.05$) a patkány hippocampusz szeletekben.

4.2.4. Hogyan befolyásolja a tovaterjedő neuronális aktivitás az ATP, adenozin illetve a glutamát felszabadulását a patkány agyszeletekben?

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az akciós potenciál gátlása milyen hatással van az ATP, adenozin és glutamát K^+ depolarizáció által kiváltott kiáramlására. A szeleteket feszültségfüggő Na^+ - csatorna blokkolóval, tetrodotoxinnal (TTX, $3 \mu\text{mol/L}$) kezelve szignifikáns gátlást kaptunk a kontroll kísérlethez képest (ATP: $0.07 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$, ADO: $0.08 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$). Ugyanez volt megfigyelhető a glutamát felszabadulás esetében is ($0.12 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$). A Na^+ - csatorna blokkoló emellett a

várákozásnak megfelelően gátolta a fEPSP aktivitást is. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a tovaterjedő akciós potenciálnak szerepe van a K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban.

A következő kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a glutamáterg excitátoros transmisszió hogyan befolyásolja a K^+ depolarizáció által kiváltott felszabadulást. A szeleteket először a non-NMDA glutamát receptor gátló CNQX (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében perfundáltuk, melynek hatására a glutamát felszabadulás szignifikánsan csökkent ($0.09 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$). Ezzel a hatással ellentétben az ATP és adenozin esetében nem regisztráltunk változást a kontroll kísérlethez képest (ATP: $1.17 \pm 0.12 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p>0.05$; ADO: $8.43 \pm 0.53 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p>0.05$). A továbbiakban a K^+ depolarizáció hatását megvizsgáltuk az NMDA receptor antagonistá D-AP-5 (10 $\mu\text{mol/L}$) és az NR2B szelektív NMDA receptor antagonistá ifenprodil (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében. Mindkét anyag szignifikánsan csökkentette az ATP és adenozin kiáramlást: (D-AP-5, ATP: $0.11 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p>0.01$; ADO: $0.11 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$), (ifenprodil, ATP: $0.13 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$; ADO: $0.11 \pm \dots \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p>0.01$).

4.2.5. Mely neurális elem vesz részt az ATP, adenozin és glutamát szabadulásában?

A következő kísérletsorozatunkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a magas K^+ hatására felszabadult ATP, adenozin illetve glutamát neuronból vagy gliából származik. Ennek a kérdésnek az eldöntésére a patkány hippocampusz szeleteket fluoroacetát (FAC, 1 mmol/L) jelenlétében vizsgáltuk. A FAC 1 mmol/L -os koncentrációban szelektíven gátolja a glia sejtekben az acetát transzportereket és ezáltal a glia oxidatív metabolizmusát. A mitokondriális gliatoxint 10 perccel az ingerlés előtt adtuk a perfúziós rendszerbe, mivel ilyen rövid ideig adva az anyag glia szelektív hatással bír. A FAC hatására az ATP felszabadulás jelentősen csökkent a második fázisban (ATP: $0.21 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$, $n=8$), ezzel ellentétben az első fázisban nem volt hatása (FAC nélkül: $0.48 \pm 0.16 \mu\text{mol/L}$, $n=8$; FAC jelenlétében: $0.54 \pm 0.16 \mu\text{mol/L}$, $n=8$, $p>0.05$). A glutamát felszabadulását is gátolta a fluoroacetát (GLUT: $0.11 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$, $n=7$; $p<0.01$). Az adenozin kiáramlásban jelentős, bár nem teljes csökkenést ($3.08 \pm 0.89 \mu\text{mol/L}$, $n=8$, $p<0.01$) okozott önmagában a FAC kezelés. A TTX (3 $\mu\text{mol/L}$) és a FAC (1 mmol/L) együttes adásával teljes gátló hatást regisztráltunk ($0.22 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $P<0.01$). Az elektromos ingerlés által kiváltott fEPSP a fluoroacetát jelenlétében is detektálható volt, ami arra utal, hogy ilyen kísérleti feltételek mellett a FAC kezelés nem gátolta a neuronok működését.

4.2.6. Milyen mechanizmussal szabadul fel az ATP, adenzin és a glutamát?

A továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy az ATP és a glutamát milyen mechanizmussal szabadul fel a patkány hippocampusz szeletekből.

A P2X7 purin receptor ion csatornaként működik és expresszálódik a hippocampusz területén, aktivációja glutamát és ATP felszabaduláshoz vezet az idegvégződéseken és az asztrocita sejt kultúrákban. Ezért elsőként a P2X7 receptor szerepét vizsgáltuk meg a K^+ depolarizáció által kiváltott purin és glutamát felszabadulásban. A hippocampusz szeleteket a szelektív P2X7 receptor antagonistá BBG (0.1 $\mu\text{mol/L}$) és AZ10606120 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében perfundáltuk. Mind a két antagonistá csökkentette a felszabadult ATP mennyiségét (BBG: $0.11 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$; AZ10606120: $0.17 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$). Ezzel ellentétben az adenzin felszabadulását a BBG részlegesen ($4.60 \pm 0.74 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$), ugyanakkor az AZ10606120 teljesen gátolta ($0.12 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$). Ugyanez volt megfigyelhető a 25 mmol/L K^+ stimuláció által kiváltott glutamát kiáramlás vizsgálatánál ($0.029 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$) is. A következőkben a carbenoxolon (CBX) hatását vettük górcső alá. A CBX egyrészt gátolja a P2X7 receptorokat, másrészt széles spektrumú réskapcsolat (gap junction) félcsatorna inhibitorként is ismert; ez utóbbi struktúrák ugyancsak képesek ATP-t áteresztetni magukon. Magas koncentrációban a CBX (100 $\mu\text{mol/L}$) gátolta a K^+ depolarizációra adott ATP, adenzin és glutamát bioszenzor választ a patkány hippocampusz szeletekben (ATP: $0.21 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$; ADO: $0.22 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$; GLUT: $0.013 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $n=6$, $p<0.01$). Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CBX alacsonyabb koncentrációban (20 $\mu\text{mol/L}$) csak a Panx1 csatornán hat, valamint immunohisztokémiai vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a P2X7 purin receptor és a Panx 1 csatorna kapcsoltn helyezkednek el. Ezért megvizsgáltuk K^+ stimulusra adott purin és glutamát felszabadulást 20 $\mu\text{mol/L}$ -os CBX jelenlétében is. Ez a kezelés gátolta az adenzin felszabadulást ($1.02 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$), de ezzel ellentétben az ATP felszabadulás szignifikánsan fokozódott ($2.22 \pm 0.37 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, $p<0.01$) az agyszzeletekben. Egy másik pannexin csatorna blokkolóval (probenecid, 150 $\mu\text{mol/L}$) is hasonló eredményeket kaptunk (ADO: $0.2 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$, $n=7$, $p<0.01$, 26. ábra; ATP: $2.70 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$, $n=7$, $p<0.01$).

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az adenzin egy része a pannexin csatornákon keresztül szabadul fel kálium (25 mmol/L) depolarizáció hatására. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a 25 mmol/L K^+ stimulus hatására az adenzin időben előbb szabadul fel mint az ATP. Az adenzin másik része valószínűleg a felszabadult extracelluláris

ATP bomlásából származik. Az ATP ezzel ellentétben a P2X7 receptoron keresztül szabadul fel, mielőtt gyorsan adenzinná bomlik.

Mivel a glutamát felszabadulás nem volt $[Ca^{2+}]_o$ függő, ezért a neuronon és a glián is megtalálható exciátoros aminosav transzporterre (EAAT1-5) terelődött a figyelmünk, mint lehetséges mechanizmus a glutamát felszabadulás kiváltásában. Az EAAT1-5 széles spektrumú glutamát transzporter gátló L-trans-2,4-PDC jelenlétében a glutamát kiáramlás szignifikánsan csökkent a patkány hippocampusz szeletekben a kontroll kísérlethez képest ($1.24 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$, $n=7$, $p<0.05$).

5. Következtetések

A disszertációm első részében a P2 receptor altípusok szerepét vizsgáltuk a patkány gerincvelő szeletekből kiáramló triciált glutamát és triciált noradrenalin felszabadulásra. Az ATP, ADP és 2-MeSADP kezelés koncentráció függően csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [^3H]glutamát felszabadulást a következő hatás erősségi sorrendben: $\text{ADP} > 2\text{-MeSADP} > \text{ATP}$. A nem-szelektív P2 receptor antagonistá suramin ($300\text{ }\mu\text{mol/L}$), illetve a $\text{P2Y}_{12,13}$ receptor szelektív antagonistá 2-MeSAMP ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) kivédte az 1 mmol/L ATP gátló hatását. Ezekkel az eredményekkel ellentétben a PPADS ($30\text{ }\mu\text{mol/L}$) és a P2Y_1 szelektív antagonistá MRS2179 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) csak részlegesen ellensúlyozták az ATP gátló hatását. A P2 receptor agonisták közül mind az ATP, az ADP és a 2-MeSADP szignifikánsan csökkentették az elektromos ingerlésre kiváltott triciált noradrenalin felszabadulást a gerincvelő szeletekből. Az agonista hatáserősségi sor a következő volt: $\text{ADP} \geq 2\text{-MeSADP} > \text{ATP}$. Ezt a gátló hatást a $\text{P2Y}_{12,13}$ -receptor antagonistá 2-MeSAMP ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) teljesen, míg a P2Y_1 receptor antagonistá MRS2179 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) részlegesen védte ki. Ezzel ellentétben a P2 receptor agonista ATP metabolikusan stabil analógja a 2-MeSATP $100\text{-}300\text{ }\mu\text{mol/L}$ koncentrációban fokozta a patkány gerincvelő szeletekben az ingerlés által kiváltott [^3H]glutamát és [^3H]noradrenalin kiáramlást. A 2-MeSATP serkentő hatását NF449 (100 nmol/L) kivédte. Az RT-PCR reakció során a patkány gerincvelőben, agytörzsben és DRG-ben a P2Y_{13} receptor altípust kódoló mRNS kifejeződött, míg a P2Y_{12} receptor altípus mRNS-e csak az agytörzsben volt kimutatható. A P2Y_1 receptor altípus expresszió szintén kimutatható volt a patkány gerincvelőben. Összességében, az eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ATP gátló hatását a glutamát felszabadulására a P2Y_{13} és/vagy a P2Y_1 receptorok közvetítik, ezzel szemben a noradrenalin felszabadulást a P2Y_{13} és/vagy a P2Y_1 valamint a P2Y_{12} receptorok együttesen szabályozzák gátló irányban. Mind a glutamát, mind a noradrenalin felszabadulás serkentése a P2X_1 -szerű receptorokon keresztül valósulhat meg.

Kutatásaink második szakaszában purinerg és glutamáterg rendszerek szerepét vizsgáltuk kálium depolarizáció (25 mmol/L , 270 sec) hatására patkány hippocampusz szeletekben. A kontinensen elsőként mikroelektród bioszenzor és extracelluláris elektrofiziológiai technika segítségével valós időben vizsgáltuk az ATP, adenzin és glutamát felszabadulást patkány hippocampusz szeletekben. A hippocampusz szeleteket 25 mmol/L -os kálium tartalmú aCSF oldattal perfundáltuk, mely hatására gyors, ugyanakkor reverzibilis ATP, adenzin és glutamát szignál emelkedést regisztráltunk. Az ARL67156 hatására szignifikánsan megemelkedett az K^+ depolarizáció által előidézett ATP felszabadulás,

valamint az ATP szint emelkedése már hamarabb, a K^+ stimulus utáni detektálható volt. A szeleteket feszültségfüggő Na^+ - csatorna blokkolóval, tetrodotoxinnal (TTX, 3 $\mu\text{mol/L}$) kezelve szignifikáns gátlást kaptunk a kontroll kísérlethez képest. A Ca^{2+} -mentes aCSF oldatra hatására az ATP és az adenzin mennyisége szignifikánsan csökkent. A non-NMDA receptor gátló CNQX jelenlétében a glutamát felszabadulás szignifikánsan csökkent, de az ATP és adenzin felszabadulás nem gátlódott. A gliatoxin fluoroacetát és a P2X7 receptor antagonistája carbenoxolon hatására az ATP, adenzin és glutamát felszabadulás jelentősen csökkent. Ezzel ellentétben az alacsony koncentrációjú CBX és probenecid emelte az adenzin felszabadulását. Az eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a felszabadult glutamát a glia sejt felszínén izgatja a NMDA/AMPA receptorokat, mely hatására glutamát és ATP szabadul fel az extracelluláris térbe. A gliából felszabaduló ATP és glutamát valószínűleg a P2X7 receptorok részvételével jut az extracelluláris térbe, mely receptorokat a neuronokból felszabadult ATP aktiválja. Az extracelluláris adenzin felhalmozódás egy része független az extracelluláris ATP bomlástól, és valószínűleg a pannexin csatornákon keresztül szabadul fel.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Heinrich A, Kittel A, Csölle C, Sylvester Vizi E, Sperlág B. (2008) Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology*, 54(2):375-86.

Heinrich A, Andó RD, Túri G, Rózsa B, Sperlág B.(2012) K⁺ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br J Pharmacol*, 167(5):1003-20.

Sperlág B, Heinrich A, Csölle C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal*, 3(4):269-84.

A disszertációtól független közlemények :

Csölle C, Heinrich A, Kittel A, Sperlág B. (2008) P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *J Neurochem*, 106(1):347-60.

Rubini P, Milosevic J, Engelhardt J, Al-Khrasani M, Franke H, Heinrich A, Sperlág B, Schwarz SC, Schwarz J, Nörenberg W, Illes P. (2009) Increase of intracellular Ca²⁺ by adenine and uracil nucleotides in human midbrain-derived neuronal progenitor cells. *Cell Calcium*, 45(5):485-98.